

Potencial de Microrganismos para a Solubilização de Fosfatos de Rocha



ISSN 1679-0154
Novembro, 2014

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 97

Potencial de Microrganismos para a Solubilização de Fosfatos de Rocha

Eliane Aparecida Gomes
Christiane Abreu de Oliveira
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Ubiana de Cássia Silva
Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Dagma Dionísia da Silva, Maria Marta Pastina, Monica Matoso Campanha, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Eliane Aparecida Gomes

1ª edição

1ª impressão (2014): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Potencial de microrganismos para solubilização de fosfatos de rocha / Eliane Aparecida Gomes ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

29 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 97).

1. Fósforo. 2. Fosfato natural. 3. Milho. I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Título. III. Série.

CDD 631.85 (21. ed.)

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	8
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	14
Conclusões	22
Referências	23

Potencial de Microrganismos para a Solubilização de Fosfatos de Rocha

Eliane Aparecida Gomes¹

Christiane Abreu de Oliveira²

Ubiraci Gomes de Paula Lana³

Ubiana de Cássia Silva⁴

Ivanildo Evódio Marriel⁵

Resumo

A seleção de microrganismos com capacidade de solubilização de fosfatos de rocha (FR) pode contribuir para reduzir a dependência de fertilizantes importados em culturas de grãos, reduzindo os custos da produção agrícola e também os impactos ambientais. Este estudo avaliou 59 microrganismos (46 bactérias e 13 fungos), isolados da rizosfera de milho, quanto à solubilização *in vitro* de fosfato de Araxá (FA) e 18 isolados (12 bactérias e 6 fungos) quanto à solubilização de fosfato de Itafós (FI). Entre estes microrganismos, 20 bactérias e 1 fungo foram considerados eficientes para a solubilização de FA e 6 bactérias foram eficientes na solubilização de FI. Houve

¹Bióloga, D.Sc. em Genética, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

²Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

³Químico, D.Sc. em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

⁴Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, ubiana@yahoo.com.br

⁵Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ivanildo.marriel@embrapa.br

diferença significativa na disponibilidade de fósforo (P) entre as cepas em ambos os fosfatos e a maioria dos isolados avaliados liberaram mais P solúvel de FI em comparação com FA. As bactérias CMSB58, CMSB32, CMSB20 e CMSB46 solubilizaram quase 20% do P total em FA e CMSB58, CMSB82, CMSB91 e CMSB48 solubilizaram mais que 25% de FI. A atividade de solubilização para ambos os fosfatos foi associada com a redução de pH, sugerindo que a acidificação do meio de cultura pode ser um dos mecanismos envolvidos na solubilização de P. Houve predominância dos gêneros *Burkholderia* e *Bacillus* no grupo de bactérias e *Talaromyces* e *Penicillium* no grupo dos fungos mais eficientes. A contribuição destes isolados na melhoria da nutrição de P em milho precisa ser investigada futuramente em experimentos em casa de vegetação e em campo, visando o desenvolvimento de inoculantes para suprimento de P para esta cultura.

Palavras-chave: Biossolubilização; fósforo; *Zea mays*; fosfato de Araxá; fosfato de Itafós.

Microorganisms with Potential for Rock Phosphate Solubilization

Eliane Aparecida Gomes¹

Christiane Abreu de Oliveira²

Ubiraci Gomes de Paula Lana³

Ubiana de Cássia Silva⁴

Ivanildo Evódio Marriel⁵

Abstract

The selection of microorganisms capable of solubilizing rock phosphates (RP) may contribute to reduce the dependence of imported fertilizers in grain crops, reducing the costs of agricultural production, and also the environmental impacts. This study tested 59 microorganisms (46 bacteria and 13 fungi) isolated from maize rhizosphere for solubilization *in vitro* of Araxá phosphate (PA) and 18 isolates (12 bacteria and 6 fungi) for solubilization of Itafós phosphate (PI). Among the microorganisms, 20 bacteria and 1 fungus were efficient for PA solubilizing and 6 bacteria were efficient for PI solubilization. There were significant differences in the availability of phosphorus (P) among strains for both phosphates and most isolates evaluated released more soluble P from PI than PA. Bacterial isolates CMSB58, CMSB32, CMSB20 and CMSB46 solubilized almost 20% of the P total in the PA and CMSB58, CMSB82, CMSB91 and CMSB48 solubilized more than 25% of the PI. The solubilizing activity of both phosphates was associated with a reduction of pH which suggests that

the acidification of the culture medium can be one of the mechanisms involved in the solubilization of P. There was a dominance of the genera *Burkholderia* and *Bacillus* in the group of the most efficient bacteria and *Talaromyces* and *Penicillium* in the fungi group. The contribution of these strains to increasing the phosphorus nutrition of grain crops should be investigated further by greenhouse and field experiments to develop inoculants to supply P to these crops.

Key words: Biosolubilization; phosphorus; *Zea mays*; Araxá phosphate; Itafós phosphate.

Introdução

Um dos fatores limitantes da agricultura nos solos tropicais é a alta capacidade de fixação de fósforo (P), resultando em uma baixa disponibilidade deste nutriente para as plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999). O fósforo é um dos macronutrientes mais limitantes à produção agrícola nestes solos e com menor eficiência de uso pelas plantas, podendo esta ser inferior a 10% (BALIGAR; FAGERIA, 2001). Este nutriente é adicionado aos solos na forma de fertilizantes fosfatados solúveis, sendo uma parte utilizada pelas plantas, enquanto que a maior parte rapidamente forma complexos insolúveis com os constituintes do solo, tornando-se indisponível para as plantas, o que leva à necessidade de frequentes aplicações deste nutriente (NOVAIS; SMYTH, 1999). Além disso, a produção de fertilizantes químicos requer energia fóssil para seu processamento, transporte e distribuição, o que aumenta os custos de produção e os riscos ambientais (SCHRÖDER et al., 2010).

Neste contexto, tem-se avaliado a utilização de fosfatos de rochas (FR) como fonte de P para as culturas. A aplicação de FR como fertilizantes em ambientes tropicais tem inúmeras vantagens, especialmente na taxa de dissolução desses fosfatos e a reação entre a superfície mineral e a solução do solo, que são intensificadas com temperatura e umidade presentes nestes solos (VAN STRAATEN, 2006).

No entanto, dependendo das propriedades do FR, solo, condições climáticas, culturas e as práticas de manejo (SALE; MOKWUNYE, 1993), até 4 anos de aplicação anual são necessários para que o FR seja tão eficiente quanto os fosfatos solúveis (GHANI et al., 1994). Além disso, o uso direto de

fontes naturais de P como fertilizantes, principalmente para as culturas anuais não é economicamente viável, especialmente em solos com alta adsorção e baixa capacidade de troca iônica (SIMPSON et al., 1997), como os solos do Cerrado brasileiro.

Desse modo, várias estratégias têm procurado a utilização de microrganismos com potencial para solubilização de FR (RAJAPAKSHA et al., 2011) visando aumentar a disponibilidade deste nutriente a partir de diferentes tipos de fosfato de baixa solubilidade (OLIVEIRA et al., 2009; SINGH; REDDY, 2011), reduzindo os custos e o gasto energético para o uso agrônômico destas fontes de P (MOHAMMADI, 2012). Além da exploração de fontes alternativas de P (GOLDSTEIN et al., 1993; KHAN et al., 2007), outra vantagem desta tecnologia é o uso de rochas com baixos teores de P, que são inadequadas para a indústria de fertilizantes por conterem alto grau de impurezas, ou seja, rochas marginais e resíduos da indústria (KHAN et al., 2007).

O mecanismo chave associado à solubilização de fosfatos minerais consiste na redução do pH do meio atribuída à liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos, tais como ácido glucônico, málico e cítrico (NAUTIYAL et al., 1999; BARROSO; NAHAS, 2008; GULATI et al., 2009). Estes ácidos orgânicos atuam removendo P inorgânico das partículas de argila do solo tanto por troca direta quanto por quelação de íons metálicos em complexos P-cátions (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). A liberação destes ácidos também resulta em acidificação da rizosfera, aumentando diretamente a solubilidade de sais de P inorgânicos precipitados (JONES, 1998). No entanto, os microrganismos do solo variam consideravelmente na sua

capacidade de secretar ácidos orgânicos e, assim, solubilizar fosfato mineral (RICHARDSON et al., 2009).

A recomendação de estirpes como inoculantes capazes de solubilizar fósforo pode variar dependendo do tipo de fosfato natural a ser aplicado. Oliveira et al. (2009) isolaram microrganismos da rizosfera de genótipos de milho eficientes no uso de P capazes de solubilizar fontes orgânicas e inorgânicas insolúveis de P. Neste trabalho, o foco foi a solubilização de fosfatos sintéticos, como o fosfato tricálcio e o fosfato de alumínio, e o potencial de solubilização de diferentes fosfatos de rocha naturais por estes microrganismos não foi avaliado.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar e selecionar entre os microrganismos isolados por Oliveira et al. (2009) as estirpes com potencial de solubilização de diferentes fontes de fosfato natural, visando sua seleção para uso em programas de biofertilização e/ou bioprocessamento de rochas fosfáticas como fonte de P para a agricultura.

Material e Métodos

Cultivo dos Microrganismos

Isolados de bactérias e fungos, pertencentes à coleção de microrganismos multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, foram avaliados quanto à capacidade de solubilização dos fosfatos de Araxá (FA) e de Itafós (FI). A maioria dos isolados foi obtida a partir de amostras de solo rizosférico de genótipos de milho contrastantes quanto à eficiência no uso de P, sob diferentes sistemas de manejo em solo de Cerrado (OLIVEIRA

et al., 2009). As culturas dos microrganismos foram reativadas em placas contendo meio de cultura BDA (200 g L⁻¹ de batata, 20 g L⁻¹ de dextrose e 15 g L⁻¹ de ágar), utilizando-se o método de estrias para a obtenção de colônias puras.

Biossolubilização de Fosfato de Rocha

Para avaliar o potencial de solubilização de P pelos microrganismos foi utilizado o meio de cultura líquido NBRIP (10 g L⁻¹ de glicose, 0,15 g L⁻¹ de (NH₄)₂ SO₄, 0,2 g L⁻¹ de KCl, 5 g L⁻¹ de MgCl₂.6H₂O e 0,25 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O) (NAUTIYAL, 1999) adicionado de 5 g L⁻¹ de FA ou FI, ambos com teor aproximado de 24% de P₂O₅.

O experimento para avaliação da biodisponibilização *in vitro* de P a partir de FA foi instalado no delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Cada unidade experimental constou de um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura adicionado do fosfato de rocha. Os tratamentos foram constituídos por 59 microrganismos inoculados no meio de cultura (46 bactérias e 13 fungos), além de duas testemunhas sem inoculação, uma contendo somente o meio de cultura e outra com o meio de cultura e FA. Para a avaliação do potencial de solubilização de FI, foram selecionados, ao acaso, 18 microrganismos (12 bactérias e 6 fungos) entre os solubilizadores de FA, priorizando o grupo de mais eficientes nesta condição, seguindo o mesmo modelo experimental.

Os microrganismos foram inoculados, separadamente, utilizando-se 5x10⁷ células por mL para as bactérias ou cinco discos de micélio de 8 mm de fungos e actinobactérias.

As culturas foram submetidas à incubação por 10 dias com agitação constante de 120 rpm e temperatura de 28 °C (OLIVEIRA et al., 2009 modificado). Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em papel Whatman nº42 para determinação da concentração de P solúvel (MURPHY; RILEY, 1962). A porcentagem de solubilização foi calculada baseada na concentração de P solúvel disponibilizada pelo microrganismo e o teor de P_2O_5 original de cada rocha. Adicionalmente, determinou-se o pH do filtrado de todas as amostras, incluindo os controles.

Para determinação da eficiência relativa dos isolados foi utilizada a seguinte expressão: $(N1-N2)/N3 \times 100$, onde N1 corresponde à concentração de P ($mg L^{-1}$) encontrada na presença de microrganismo, N2 à, concentração de P ($mg L^{-1}$) na ausência de microrganismo e N3 equivale ao teor de P total ($mg L^{-1}$) contido no fosfato de rocha. Em seguida, os microrganismos foram classificados em três grupos, de acordo com o isolado que demonstrou o maior desempenho na solubilização de P: eficientes (67 a 100%), moderadamente eficientes (35,5 a 67%) e ineficientes (0 a 35,5%).

Extração de DNA Genômico de Bactérias e Fungos e Amplificação por PCR

O DNA genômico foi extraído das bactérias a partir de culturas incubadas em meio LB a 37 °C por 24 horas utilizando a metodologia de fenol/clorofórmio, adaptada de Ausubel et al. (1987) e a região 16S do rDNA foi amplificada com os *primers* F968 e R1401 (NUBEL et al., 1996). A região ITS rDNA (sequência interna transcrita do DNA ribossômico) dos fungos

foi amplificada com os *primers* universais, ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) a partir de DNA genômico extraído de acordo com o método de Raeder e Broda (1985). A reação de PCR foi realizada num volume final de 50 μ L, contendo 20 ng de DNA, Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; dNTPs 0,125 mM, *primers* 0,4 μ M; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e formamida 1% (v/v) para as análises de bactérias ou DMSO 0,2% (v/v) para fungos. A amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, com uma extensão final de 72 °C por 10 min para as bactérias. Para os fungos, a amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições: 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 90 seg, com uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos da reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) corados com brometo de etídeo (1 μ g mL⁻¹) e visualizados no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, EUA).

Os produtos da amplificação foram removidos do gel, purificados com o kit "QIAquick Gel Extraction" (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados utilizando-se o Kit "Big Dye Terminator" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. As amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sendo as sequências comparadas com o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast N (ALTSCHUL et al., 1997).

Análise Estatística

Os dados obtidos da atividade solubilizadora de fosfato e pH dos microrganismos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2008). A correlação (r) linear entre o fosfato solubilizado em meio de cultura líquido e o pH foi feita utilizando o programa Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). As diferenças obtidas ao nível de $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados e Discussão

Entre os 59 microrganismos avaliados, 43% das bactérias foram classificadas como eficientes na solubilização de fosfato de Araxá (FA), 11% classificadas como moderadamente eficientes e 46% classificadas como ineficientes. Dentro os fungos, 8% foram eficientes, 23% moderadamente eficientes e 69% ineficientes. Entre os 18 isolados avaliados para solubilização de fosfato de Itafós (FI), 50% das bactérias foram eficientes, 8% foram moderadamente eficientes e 42% ineficientes. No grupo dos fungos, 33% dos isolados foram classificados como moderadamente eficientes e 67% como ineficientes (Figura 1).

A análise estatística demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as estirpes e os valores de solubilização de FA oscilaram de 0,94 a 100,70 mg P L⁻¹. Dentre as bactérias, o isolado CMSB58 (*Burkholderia*) e CMSB32 (*Bacillus*) foram os mais eficientes, disponibilizando 100,70 e 94,98 mg P L⁻¹, respectivamente. Entre os fungos, os isolados que demonstraram maior capacidade de solubilização do FA foram CMSF14 (*Penicillium*), CMSF102 e CMSF105 (*Talaromyces*), que solubilizaram 75,54, 55,70 e 54,83 mg P L⁻¹, respectivamente.

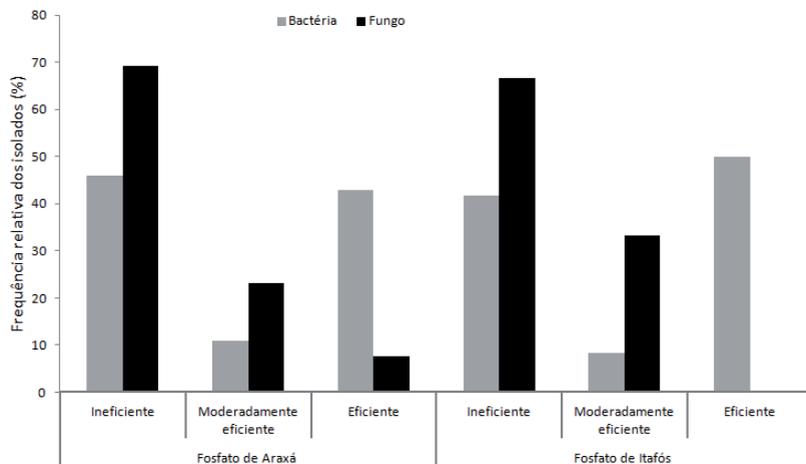


Figura 1. Eficiência relativa dos isolados na solubilização dos fosfatos de Araxá e Itafós.

De modo similar, a biossolubilização do FI apresentou variação significativa ($p \leq 0,05$) entre as 18 estirpes analisadas, incluindo fungos e bactérias. As maiores taxas de solubilização do FI foram observadas pelas estirpes CMSB58, CMSB48 e CMSB82, do gênero *Burkholderia*, resultando na liberação de 153,11, 135,58 e 132,88 mg P L⁻¹, respectivamente. Em relação à capacidade de solubilização de FI pelos fungos, os melhores isolados foram CMSF14, CMSF102 e CMSF105, liberando 71,36, 66,55 e 45,24 mg P L⁻¹, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação molecular do microrganismo, fósforo (P) solubilizado (mg L^{-1}), porcentagem de solubilização de P total da rocha e pH do meio de cultura depois de 10 dias de crescimento a 28 °C. Os valores apresentados são médias de três repetições.

Isolado	Taxon	Espécie (número de acesso) Índice de Similidade	Fosfato de Araxá			Fosfato de Itarós		
			P (mg L^{-1})	P (%)	pH	P (mg L^{-1})	P (%)	pH
CMSB58	Bactéria	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY509957) – 89%	100,70 a	19,74 a	3,05 a	153,11 a	29,20 a	3,04 a
CMSB32	Bactéria	<i>Bacillus pumilus</i> (FJ641028) – 99%	94,98 a	18,62 a	3,15 a	11,02 g	2,10 g	4,33 d
CMSB20	Bactéria	<i>Paenibacillus</i> não cultivada (EU647536) – 99%	93,45 a	18,32 a	3,15 a	-	-	-
CMSB46	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (FJ644952) – 96%	92,78 a	18,18 a	3,18 a	-	-	-
CMSB82	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (AB480713) – 98%	91,47 a	17,93 a	3,19 a	132,88 b	25,34 b	3,16 a
CMSB91	Bactéria	<i>B. cenocepacia</i> (EF602557) – 98%	90,60 a	17,76 a	3,19 a	126,21 b	24,07 b	3,14 a
CMSB48	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (FJ4334111) – 90%	89,03 a	17,45 a	3,22 a	135,58 b	25,85 b	3,15 a
CMSB5	Bactéria	<i>B. cepacia</i> (EF602558) – 98%	88,77 a	17,40 a	3,19 a	105,96 c	20,21 c	3,20 a
CMSB70	Bactéria	<i>B. subtilis</i> (FJ483514) – 89%	86,28 a	16,91 b	3,12 a	16,84 g	3,21 g	4,08 c
CMSB62	Bactéria	<i>Arthrobacter</i> sp. (AF408967) – 98%	85,31 a	16,72 b	3,11 a	7,19 h	1,37 h	4,30 d
CMSB94	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (FJ434111) – 89%	82,62 a	16,19 b	3,10 a	-	-	-
CMSB37	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (AB480713) – 96%	79,77 b	15,63 b	3,08 a	-	-	-
CMSB43	Bactéria	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (AF068009) – 96%	79,33 b	15,55 b	3,07 a	-	-	-
CMSB11	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (FJ930075) – 97%	76,74 b	15,04 c	3,09 a	-	-	-
CMSF14	Fungo	<i>Penicillium pinophilum</i> (EU360183) – 95%	75,54 b	14,81 c	3,73 a	71,36 d	13,61 d	3,51 b
CMSB44	Bactéria	<i>B. cepacia</i> (GQ359110) – 98%	75,00 b	14,70 c	3,08 a	-	-	-
CMSB17	Bactéria	<i>Serratia</i> sp. (HM045833) – 96%	71,45 b	14,00 c	3,19 a	-	-	-
CMSB86	Bactéria	<i>Arthrobacter</i> sp. (DO985470) – 89%	71,37 b	13,99 c	3,16 a	0,00 i	0,00 i	4,25 d
CMSB124	Bactéria	<i>Arthrobacter</i> sp. (FJ685644) – 97%	71,28 b	13,97 c	3,17 a	0,00 i	0,00 i	4,46 e
CMSB2	Bactéria	<i>Pantoea ananatis</i> (FJ611812) – 94%	71,15 b	13,95 b	3,16 a	98,28 c	18,74 c	3,24 a
CMSB116	Bactéria	<i>B. pumilus</i> (FJ641028) – 99%	70,02 b	13,72 b	3,22 a	-	-	-
CMSB45	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (FJ930075) – 98%	62,29 c	12,21 d	3,43 a	-	-	-
CMSB119	Bactéria	<i>B. subtilis</i> FJ483514 – 89%	61,27 c	12,15 d	3,20 a	107,39 c	20,48 c	3,17 a

Tabela 1. Cont. Identificação molecular do microrganismo, fósforo (P) solubilizado (mg L⁻¹), porcentagem de solubilização de P total da rocha e pH do meio de cultura depois de 10 dias de crescimento a 28 °C. Os valores apresentados são médias de três repetições.

Isolado	Taxon	Espécie (número de acesso) Índice de Similaridade	Fosfato de Araxá			Fosfato de Itatós		
			P (mg L ⁻¹)	P (%)	pH	P (mg L ⁻¹)	P (%)	pH
CMSF102	Fungo	<i>Talaromyces rotundus</i> (EU497950) – 95%	55,70 c*	10,92 d	3,58 a	45,24 e	8,63 e	3,47 b
CMSF105	Fungo	<i>T. rotundus</i> (AF285115) – 95%	54,83 c	10,75 d	3,62 a	66,55 d	12,69 d	3,65 b
CMSB4	Bactéria	<i>S. maltophilia</i> (FU481929) – 89%	45,78 d	8,97 e	3,44 a	-	-	-
CMSB65	Bactéria	<i>Pseudomonas</i> não cultivada (FU542901) – 95%	42,08 d	8,25 e	3,38 a	-	-	-
CMSF94	Fungo	<i>T. rotundus</i> (AF285115) – 94%	40,67 d	7,93 e	3,61 a	-	-	-
CMSB7	Bactéria	<i>Citrobacter</i> sp. (GU056358) – 99%	35,03 d	6,87 f	3,93 b	-	-	-
CMSF87	Fungo	<i>Acremonium strictum</i> (AY138846) – 93%	33,70 d	6,61 f	3,77 b	-	-	-
CMSB15	Bactéria	<i>Sinomonas flava</i> (EU370704) – 97%	32,42 d	6,35 f	4,65 b	-	-	-
CMSB76	Bactéria	<i>Pantoea</i> sp. (GU271945) – 96%	30,16 e	5,91 f	3,55 a	-	-	-
CMSB3	Bactéria	<i>Bacillus</i> sp. (EU864320) – 89%	25,79 e	5,05 f	3,91 b	-	-	-
CMSB6	Bactéria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (FU976598) – 98%	23,74 e	4,65 f	3,89 b	-	-	-
CMSA62	Bactéria	<i>Streptomyces</i> sp. (AB366323) – 96%	18,54 f	3,63 g	4,10 b	-	-	-
CMSF80	Fungo	<i>T. rotundus</i> (EU497950) – 94%	18,29 f	3,68 g	3,81 b	36,25 f	6,91 f	4,83 f
CMSB1	Bactéria	<i>B. megaterium</i> (FU393316) – 92%	17,70 f	3,47 g	4,24 b	-	-	-
CMSB121	Bactéria	<i>Pseudomonas</i> não cultivada (HM011904) – 98%	17,69 f	3,47 g	4,24 b	-	-	-
CMSF93	Fungo	<i>Aspergillus terreus</i> (AY822631) – 99%	12,93 f	2,63 g	5,22 d	14,65 g	2,79 g	4,53 e
CMSF95	Fungo	<i>P. citrinum</i> (FU571468) – 97%	12,71 f	2,49 g	4,04 b	-	-	-
CMSF96	Fungo	<i>T. rotundus</i> (AF408967) – 98%	10,49 g	2,06 h	4,70 d	-	-	-
CMSB104	Bactéria	<i>B. cereus</i> (DQ884352) – 90%	10,32 g	2,02 h	5,49 d	-	-	-
CMSF50	Fungo	<i>A. terreus</i> (FU462767) – 95%	10,01 g	1,96 h	4,65 c	-	-	-
CMSB118	Bactéria	<i>B. pumilus</i> (FU641028) – 96%	9,69 g	1,90 h	4,47 c	-	-	-
CMSF39	Fungo	<i>A. terreus</i> (AJ001333) – 99%	8,57 g	1,68 h	4,38 c	-	-	-
CMSA80	Bactéria	<i>Streptomyces bungeensis</i> (FU486371) – 94%	7,73 g	1,52 h	4,40 c	-	-	-

Tabela 1. Cont. Identificação molecular do microrganismo, fósforo (P) solubilizado (mg L^{-1}), porcentagem de solubilização de P total da rocha e pH do meio de cultura depois de 10 dias de crescimento a 28 °C. Os valores apresentados são médias de três repetições.

Isolado	Taxon	Espécie (número de acesso) Índice de Similaridade	Fosfato de Atraxá			Fosfato de Itafós		
			P (mg L^{-1})	P (%)	pH	P (mg L^{-1})	P (%)	pH
CMSB18	Bactéria	<i>Bacillus</i> sp. (EU864320) – 92%	7,42 g	1,45 h	4,66 d	-	-	-
CMSB16	Bactéria	<i>B. pumilus</i> (EU586783) – 97%	724 g	1,42 h	4,70 d	-	-	-
CMSA14	Bactéria	<i>Streptomyces</i> sp. (AB369480) – 98%	705 g	1,38 h	4,76 d	-	-	-
CMSF40	Fungo	<i>A. terreus</i> (AY822630) – 99%	6,95 g	1,36 h	4,28 c	4,78 i	0,91 i	4,04 c
CMSB52	Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp. (AM992063) – 90%	6,70 g	1,31 h	7,33 f	-	-	-
CMSB19	Bactéria	<i>Paenibacillus</i> não cultivada (FJ481059) – 94%	6,05 g	1,19 h	4,81 d	-	-	-
CMSA68	Bactéria	<i>S. spinicomarensis</i> (AB184535) – 91%	5,53 g	1,08 h	4,59 d	-	-	-
CMSA83	Bactéria	<i>Streptomyces</i> sp. (EU360176) – 94%	5,37 g	1,05 h	4,72 d	-	-	-
CMSB31	Bactéria	<i>B. pumilus</i> (EU147190) – 97%	3,52 g	0,69 h	4,74 d	-	-	-
CMSF79	Fungo	<i>A. terreus</i> (FJ462767) – 98%	2,35 g	0,46 h	4,65 d	-	-	-
CMSA4	Bactéria	<i>S. tubercidicus</i> (FJ406112) – 96%	1,72 g	0,34 h	5,02 d	-	-	-
CMSA19	Bactéria	<i>S. chartreusis</i> (EU647536) – 90%	0,94 g	0,18 h	4,67 d	-	-	-
Controle	Não Inoculado	-	1,02 g	0,20 h	6,80 e	1,54 i	0,30 i	6,00 g

*Valores seguidos pela mesma letra (coluna) não diferem significativamente ($p>0,05$) a 95% confiança.

Valores similares de solubilização de P são comuns na literatura. Xiao et al. (2008) investigaram a solubilização de fosfato de rochas (FR) por *Candida krissii*, *Penicillium expansum* e *Mucor ramosissimus* isolados de minas de fosfato na China e observaram que o teor máximo de P solúvel foi de 109,3 mg L⁻¹ liberado por *C. krissii*, seguido por 104,5 mg L⁻¹ (*P. expansum*) e 99,9 mg L⁻¹ (*M. ramosissimus*). Rajapaksha et al. (2011) também observaram que a solubilização de fosfato de rocha por seis bactérias isoladas da rizosfera de arroz variou de 50 a 150 mg P L⁻¹.

O gênero *Burkholderia* tem sido relatado na literatura como uma rizobactéria promotora do crescimento de plantas eficiente na solubilização de P de diferentes fontes (PEIX et al., 2001; ANANDHAM et al., 2007; MARRA et al., 2011; AZZIZ et al., 2012). Este gênero tem sido isolado associado com a rizosfera de milho, variando de 4 a 35% do total de bactérias cultiváveis presentes na rizosfera desta cultura (HEBBAR et al., 1994; BALANDREAU et al., 2001). Além de *Burkholderia*, os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* juntamente com *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* entre os fungos, têm sido relatados como solubilizadores de P, promotores do crescimento de plantas e utilizados como inoculantes comerciais (KHAN et al., 2007, 2010; SCERVINO et al., 2010; NARAGHI et al., 2012; SHARMA et al., 2013; AHMAD; KIBRET, 2014).

Todas as estirpes que solubilizaram o fosfato em meio líquido reduziram o pH do meio de cultura em comparação com o controle não inoculado, independentemente da fonte de fosfato utilizada. Foi observada uma correlação negativa e significativa entre a quantidade de fósforo solúvel e o pH final do meio de cultura ($r = -0,89$ para o FI e $r = -0,82$ para FA, $p < 0,01$).

A comparação dos resultados de biossolubilização de FA e FI pelos mesmos isolados demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$). A solubilização de FI foi maior do que a FA nos isolados CMSB2, CMSB5, CMSB48, CMSB58, CMSB82, CMSB91, CMSB119, CMSF80 e CMSF105. Por outro lado, CMSB32, CMSB70, CMSB62, CMSB86, CMSB124 e CMSF102 mostraram resultados opostos, sendo mais eficientes na solubilização de FA, solubilizando menos de 3% de FI (Tabela 1 e Figura 2). Interessantemente, enquanto que a maior parte dos isolados eficientes na solubilização de FI pertence ao gênero *Burkholderia*, a maioria dos isolados eficientes na solubilização de FA pertence aos gêneros *Bacillus* e *Arthrobacter* (Tabela 1). Os isolados CMSB58 e CMSF14 destacaram-se na biossolubilização de ambas as fontes de fosfatos avaliadas, o que demonstra elevado potencial destes isolados em agregar valor fertilizante a estes minerais, sendo por isso, um bom candidato para a produção de biofertilizantes a serem usados na cultura do milho.

Uma explicação para a diferença observada na solubilização de ambos os tipos de FR se baseia nas diferentes características físico-químicas das rochas, em função do seu material de origem e o tamanho de partícula, que influenciam a sua taxa de solubilização (LOUREIRO et al., 2008). Os fosfatos de origem sedimentar, tais como FI, geralmente, apresentam maiores teores de P disponíveis em comparação aos de origem ígnea ou metamórfica, como o FA que exhibe elevado nível de cristalização e baixa solubilidade em ácido cítrico (KLIEMANN; LIMA, 2001). Devido a estas características, as rochas apresentam diferenças significativas na biodisponibilidade de nutrientes naturais, que podem ser alterados pela presença de microrganismos (RICHARDSON; SIMPSON, 2011). Outros

autores, como Mendes et al. (2013) demonstraram que o fluoreto, presente em diferentes tipos de rochas, podem também limitar a solubilização de FA por *A. niger*, pois afeta negativamente os processos metabólicos envolvidos na solubilização de fosfato, tais como o crescimento dos fungos, diminuindo assim, a produção de ácido cítrico.

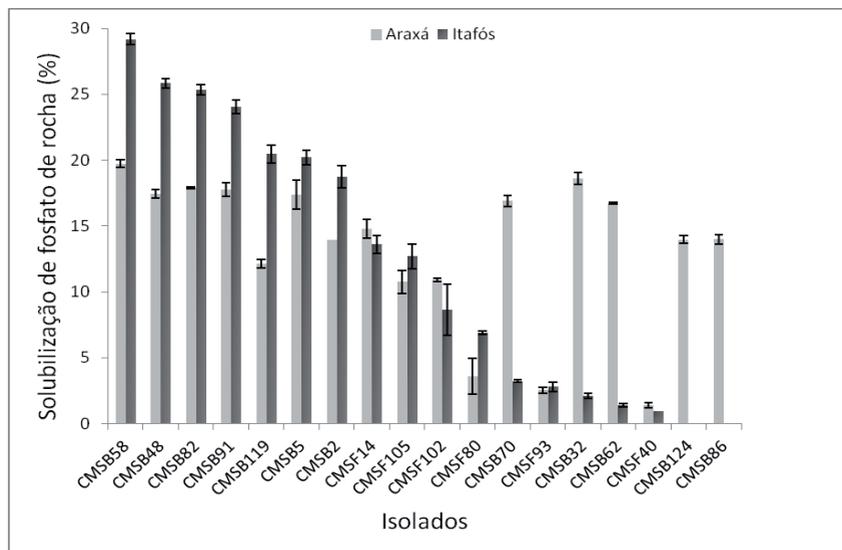


Figura 2. Porcentagem de solubilização de P total dos fosfatos de Araxá e Itafós de 18 isolados de fungos e bactérias. Identificação dos isolados está de acordo com a Tabela 1.

As diferenças observadas no presente trabalho podem contribuir para o processo de seleção de microrganismos solubilizadores de fosfatos naturais. De acordo com estes resultados, pode-se sugerir que, para cada tipo de rocha a ser utilizado, existem diferentes microrganismos que têm potencial para solubilização de P. Estes microrganismos apresentam potencial para a produção de inoculantes para milho, uma vez que a maioria dos microrganismos selecionados é capaz de

solubilizar os dois tipos de fosfatos de rochas avaliados, assim como outras fontes inorgânicas, tais como fosfato de alumínio. Além disso, alguns destes isolados também têm a capacidade de mineralizar fontes orgânicas de P, como a lecitina de soja e fitato (OLIVEIRA et al., 2009).

Conclusões

Houve diferença significativa na disponibilidade de P entre os isolados, sendo que a maioria deles solubilizou maior quantidade de P a partir de FI do que FA e a maioria das bactérias foi eficiente na solubilização de P de ambos os tipos de rochas. Houve uma correlação negativa entre o pH final do meio de cultura e a concentração de fosfato solúvel, sugerindo que a produção de ácidos pode ser um dos mecanismos envolvidos na solubilização de P por estes microrganismos. Os gêneros *Burkholderia* e *Bacillus* foram predominantes no grupo dos microrganismos mais eficientes. Juntos, estes microrganismos serão avaliados em experimentos em casa de vegetação e no campo, usando diferentes tipos de FR e veículos de inoculação, visando o desenvolvimento de inoculantes para suprimento de P a ser oferecida aos agricultores, como produtos tecnológicos para a redução dos custos com fertilizantes e dos impactos ambientais.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (Fapemig) e à Embrapa Milho e Sorgo.

Referências

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, p. 1-20, 2014.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANANDHAM, R.; CHOI, K. H.; GANDHI, P. I.; YIM, W. J.; PARK, S. J.; KIM, K. A.; MADHAIYAN, M.; SA, T. M. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 23, p. 1121-1129, 2007.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SIDEMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: J. Wiley, 1987.

AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGHJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, Á.; IGUAL, J. M.; ARIAS, A. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **Applied Soil and Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 320-326, 2012.

BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and**

Environmental Microbiology, Washington, v. 67, p. 982-985, 2001.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K.; HE, Z. L. Nutrient use efficiency in plants. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, p. 529-535, 2008.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

GHANI, A.; RAJAN, S. S. S.; LEE, A. Enhancement of phosphate rock solubility through biological processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, p. 127-136, 1994.

GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Mining by microbe: separating phosphate from ore via bioprocessing. **Nature Biotechnology**, Frankfurt, v. 11, p. 1250-1254, 1993.

GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R. C. Plant growth promoting and rhizosphere competent *Acinetobacter rhizosphere* strain BIHB 723 from the cold desert of Himalayas. **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 371-377, 2009.

HEBBAR, K. P.; MARTEL, M. H.; HEULIN, T. *Burkholderia cepacia*, a plant growth promoting rhizobacterial associate of maize. In: RYDER, M. H.; STEPHENS, P. M.; BOWEN, G. D. (Ed.). **Improving plant productivity with rhizosphere bacteria**. Adelaide:

Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1994. p. 201-203.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 205, p. 25-44, 1998.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi: current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, London, v. 56, p. 73-98, 2010.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A., WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.

KLIEMANN, H. J.; LIMA, D. V. Eficiência agronômica de fosfatos naturais e sua influência no fósforo disponível em dois solos de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, p. 111-119, 2001.

LOUREIRO, F. E. L.; MONTE, M. B. M.; NASCIMENTO, M. **Agrominerais: fosfato em rochas e minerais industriais: usos e especificações**. 2. ed. Rio de Janeiro: CETEM, 2008.

MARRA, L. M.; OLIVEIRA, S. M.; SOARES, C. R. F. S.; MOREIRA, F. M. S. Solubilization of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, p. 603-609, 2011.

MENDES G. O.; VASSILEV, N. B.; BONDUKI, V. H.; SILVA, I. R. da; RIBEIRO JR., J. I.; COSTA, M. D. Inhibition of *Aspergillus*

niger phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, p. 4906-4913, 2013.

MOHAMMADI, K. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Resource and Environment Journal**, Rosemead, v. 2, p. 80-85, 2012.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 27, p. 31-36, 1962.

NARAGHI, L.; HEYDARI, A.; REZAEI S.; RAZAVI M. Biocontrol Agent *Talaromyces flavus* stimulates the growth of cotton and potato. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 31, p. 471-477, 2012.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; MUZZI, M. R. S.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsfordv, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

PEIX, A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Pasheolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, p. 1927-1935, 2001.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from *filamentous fungi*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RAJAPAKSHA, R. M. C. P.; HERATH, D.; SENANAYAKE, A. P.; SENEVIRATHNE, M. G. T. L. Mobilization of rock phosphate phosphorus through bacterial inoculants to enhance growth and yield of wetland rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 42, p. 301-314, 2011.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J.-M.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 305-339, 2009.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, p. 989-996, 2011.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, p. 319-339, 1999.

SALE, P.W. G.; MOKWUNYE, A. U. Use of phosphate rocks in the tropics. **Fertilizer research**, Boon, v. 35, p. 33-45, 1993.

SCERVINO, J. M.; MESA, M. P.; MÓNICA, I. D.; RECCHI, M.; MORENO, N. S.; GODEAS, A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 755-763, 2010.

SCHRÖDER, J. J.; CORDELL, D.; SMIT, A. L.; ROSEMARIN, A. **Sustainable use of phosphorus**. Wageningen: Plant Resource International, 2010. 122 p.

SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, p. 587, 2013.

SIMPSON, P. G.; SALE, P.W. G.; TENNAKOON, S. B. An economic analysis of the Field performance of North Carolina reactive phosphate rock compared with single superphosphate for selected sites from the national reactive phosphate rock project. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 37, p. 1061-1076, 1997.

SINGH, H.; REDDY, M. S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils.

European Journal of Soil Biology, Montrouge, v. 47, p. 30-34, 2011.

VAN STRAATEN, P. Farming with rocks and minerals: challenges and opportunities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 731-747, 2006.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY,

J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

XIAO, C.-Q.; CHIB, R.-A.; HUANG, X.-H.; ZHANG, W.-X.; QIU, G.-Z.; WANG, D.-Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 33, p. 187-193, 2008.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

